

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(19) Eur pâisches Pat ntamt  
Eur p an Patent Office  
Office européen d s brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 090 997  
A2

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 83102773.5

(51) Int.Cl.<sup>3</sup>: A 61 L 15/04  
A 61 L 15/03

(22) Anmeldetag: 21.03.83

(30) Priorität: 02.04.82 DE 3212412

(71) Anmelder: Dr. Ruhland Nachf. GmbH  
Stadtplatz 7  
D-8425 Neustadt/Donau(DE)

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
12.10.83 Patentblatt 83/41

(72) Erfinder: Stemberger, Axel, Dr.-rer.nat.  
Cramer-Klett-Strasse 35e  
D-8014 Neubiberg(DE)

(44) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(74) Vertreter: Hansen, Bernd, Dr.rer.nat. et al,  
Hoffmann, Eitie & Partner Patentanwälte  
Arabellastrasse 4  
D-8000 München 81(DE)

(54) Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage.

(57) Gewebeverklebbare, flächenförmige, kollagene Wundauflage aus Kollagen und Fibrinogen die schichtweise aufgebaut ist und eine 0,3 bis 2 cm dicke Kollagenschicht enthält, die wenigstens an einer Oberfläche eine 0,2 bis 2 mm dicke Fibrinogenschicht mit einer Fibrinogenmenge von 0,5 bis 10 mg/cm<sup>2</sup> aufweist und eine verbesserte Wundheilung ermöglicht.

EP 0 090 997 A2

Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage

Kollagen wird seit geraumer Zeit in der Chirurgie verwendet. Es kann in Form von Schwämmen oder Fasern zur Blutstillung verwendet werden und ist auch nach entsprechender Modifizierung zur Beschleunigung der 5 Wundheilung geeignet. Bei Patienten mit defekter Blutgerinnung oder bei großflächigen Blutungen genügen übliche kollagene Wundauflagen nicht. Man hat daher bereits versucht, Kollagenmaterial mit dem Gewebe zu verkleben, wobei man Kleber auf Basis Resorcin-For-10 maldehyd, Kollagen oder Gelatine verwendete. Solche Kleber sind zwar hämostyptisch, jedoch wegen ihrer Toxizität für die Praxis ungeeignet. Dies gilt auch für Acrylatkleber und die Kombination mit kollagenen Wundauflagen.

15

Es ist bekannt, daß Kollagen kovalente Vernetzungen mit Bindegewebestandteilen eingehen kann. Dabei finden Vernetzungen vom Kollagen über Schiff-Basen sowie Aldolkondensation statt. Bekannt ist auch, daß 20 bei Basalmembranen die Gewebefestigkeit zusätzlich durch S-S Brücken des Basalmembrankollagens erreicht wird. Bekannt ist weiterhin, Proteine, wie Albumin mit intermolekularen S-S Bindungen nach milder

Réduktion und nachfolgender Oxidation über S-S  
Brücken zu vernetzen.

Bei Verletzungen bildet sich durch die Blutgerinnung

5 ein primärer Wundverschluß. Hierfür sind aggregierte Thrombozyten und ein Fibrinnetzwerk verantwortlich. Es ist bekannt, daß einzelne Fibrinmoleküle durch Transglutaminasen (wie Faktor XIII) vernetzt werden.

Hierbei bilden sich neue Peptidbindungen zwischen Glut-  
10 aminäsäure und Lysin benachbarter Ketten. Mit der Technik der Fibrinklebung, also durch Verwendung von Fibrinogen und Thrombin, wird die Endphase der plasmatischen Blutgerinnung nachgeahmt.

15 Die Fibrinklebung allein ist nicht in der Lage, großflächige Blutungen zu stillen. Dies gelingt erst durch eine kombinierte Anwendung der Fibrinklebung mit einer resorbierbaren kollagenen Wundauflage. Jedoch muß man dabei drei Komponenten bereithalten;

20 nämlich die kollagene Wundauflage, Thrombinlösung mit Antifibrinolytika und eine tiefgefrorene hochkonzentrierte Fibrinogenlösung. Da Blutungen häufig plötzlich und unprogrammiert auftreten, stehen diese drei Komponenten im entscheidenden Augenblick

25 häufig nicht anwendungsbereit zur Verfügung, denn zumindest die tiefgefrorene Fibrinogenlösung muß zuvor aufgetaut werden. Auch das Mischen vor der Applikation ist verhältnismäßig kompliziert.

30 In der "Wiener medizinische Wochenschrift Nr. 7 (1976)" wird auf den Seiten 86 bis 89 über die lokale Anwendung von Fibrinogen und Kollagen zur Blutstillung in der Herzchirurgie berichtet. Bei der Technik der dort beschriebenen Klebung verwendet man humanes Fibrinogen-

35 Kryopräzipitat, Thrombin, ein Faktor XIII Konzentrat

sowie ein Kollagenvlies. Das Fibrinogen wird auf die gewünschte Stelle aufgebracht und dort durch den Zusatz der Thrombinlösung und von Faktor XIII zur Gerinnung gebracht. Bei stärkeren Blutungen wendet 5 man das Kollagenvlies als vollständig resorbierbare Trägersubstanz an, wobei man auf das Kollagenvlies die Lösungen aufträgt und anschließend das Kollagen mit der mit Fibrinogen beschichteten Seite auf die blutende Stelle aufpreßt. Dadurch soll eine vollständige 10 Auspolymerisierung des Fibrins und Haftung der Fibrinfasern im Gewebe erfolgen. Bei dieser Klebetechnik erfolgt die Beschichtung des Kollagens mit Fibrinogen erst unmittelbar vor der Anwendung, um ein Kollabieren des Kollagenschwammes weitgehend zu vermeiden.

15

Aufgabe der Erfindung ist es, dem Chirurgen eine kollagene Wundauflage zur Verfügung zu stellen, die in vorbereiteter Form direkt während der Operation angewendet werden kann und wobei die vorerwähnten Nachteile der 20 Fibrinklebung in Kombination mit resorbierbarem Kollagen nicht auftreten. Verbunden mit dieser Aufgabe ist es, eine lagerfähige Kollagenzubereitung zur Verfügung zu stellen, die die für die Einleitung der lokalen Hämostase erforderlichen Komponenten enthält.

25

Diese Aufgabe wird durch eine gewebeverklebbare, kollagene Wundauflage gemäß dem Anspruch 1 gelöst.

Die erfindungsgemäße Wundauflage hat einen schichtweisen Aufbau. Die Hauptschicht besteht hierbei aus dem Kollagen und zwar hat diese Schicht eine Dicke zwischen etwa 0,3 und 2 cm, vorzugsweise 0,7 bis 1 cm. Einseitig oder beidseitig auf dieser Kollagenschicht befindet sich eine Fibrinogenschicht. Diese Fibrinogenschicht hat eine 30 Dicke von etwa 0,2 bis 2 mm und wird auf die Kollagenoberfläche aufgebracht, wobei eine Verankerung der 35

0090997

Fibrinogenmoleküle mit den Kollagenmolekülen im Grenzgebiet der Schichten vorliegt.

Wesentlich ist, daß die Fibrinogenschicht, Fibrinogen  
5 in einer Menge von 0,5 bis 10 mg, vorzugsweise 4 mg/cm<sup>2</sup>  
enthält.

Es ist häufig vorteilhaft, wenn das Fibrinogen das  
einseitig oder beidseitig auf das Kollagen als Schicht  
10 aufgebracht wird, freie SH-Gruppen enthält. Diese freien  
SH-Gruppen können zuvor in dem Fibrinogen durch reduktive Spaltung der Disulfidbrücken ausgebildet sein,  
oder indem man Fibrinogen mit SH-Gruppen haltigen Fi-  
brinogen abmischt. Weiterhin ist es auch möglich die in  
15 Fibrinogen enthaltenen Disulfidbrücken unverändert zu  
lassen und zusätzlich SH-Gruppen einzubauen, z.B. nach  
der Methode von Benesch & Benesch in "Proceedings of  
the National Academy of the USA, Washington", Band 44,  
1958, S. 848 bis 853 oder Biochem. Journ. 1966 101, Seiten  
20 717 bis 720 (Stephen und Mitarbeiter).

Es kann vorteilhaft sein, wenn neben dem Fibrinogen  
wenigstens eine der Schichten noch Antifibrinolytika  
und/oder polyvalente Proteinaseinhibitoren enthält,  
25 wobei außerdem noch Thrombin vorhanden sein kann, mit  
dem Proviso, daß das Thrombin sich nicht in der gleichen  
Schicht oder in unmittelbarem Kontakt mit Fibrinogen  
befindet.

30 Die Herstellung der erfindungsgemäßen kollagenen Wundaflage kann in folgender Weise erfolgen:

zunächst wird Kollagen in an sich bekannter Weise präpariert. Das Kollagen soll dabei vorzugsweise einen Reinheitsgrad, ausgedrückt durch das Gewichtsverhältnis von Stickstoff zu Hydroxyprolin < 4, insbesondere < 3 aufweisen.

$$\text{Faktor N/Hyp} = \frac{\text{mg N}}{\text{mg 4-Hyp}}$$

J. Mol. Bio. 44 1969 Seite 161.

10 Eine 1,5 %-ige Kollagenlösung in 0,05 %-iger Essigsäure wird in bekannter Weise zu einem 0,5 cm dicken Kollagenschwamm gefriergetrocknet. Erwünschtenfalls kann man bei dieser Gefrieretrocknung auch eine Lösung einsetzen, welcher man zuvor Antifibrinolytika  
15 (Tranexamsäure) und/oder poyvalente Proteinaseinhibitoren (Aprotinin) zugegeben hat, wobei diese in solchen Mengen zugegeben werden, daß im fertigen Kollagenschwamm pro cm<sup>2</sup> eine Konzentration von 0,2 bis 10 mg bzw. 4-bis 1000 KIE vorliegt.

20

Getrennt von der Herstellung des Kollagenschwamms wird eine Fibrinogenlösung wie folgt hergestellt:

25 Fibrinogen für Infusionszwecke wird in isot. NaCl bis zu einer Konzentration von 30 mg Fibrinogen pro ml gelöst. Diese Lösung wird dann mit einer üblichen Sprühvorrichtung auf den zuvor hergestellten Kollagenschwamm unter sterilen Kautelen in einer Dicke von 0,2 bis 2 mm aufgesprüht, die eine Menge von 0,5  
30 bis 10 mg/cm<sup>2</sup> ergibt, sofort gefriergetrocknet, wobei die dadurch ausgebildete Schichtdicke in der Regel 2 mm Schichthöhe nicht übersteigen darf, weil sonst die Haftung dieser Schicht schlecht ist. Mit dieser Technik wird eine ausreichende Verankerung in der Kollagenmatrix sichergestellt. Gewünschtenfalls können auch  
35

in die Fibrinogenschicht Antifibrinolytika und/oder polyvalente Proteininasenhibitoren eingearbeitet werden.

Es ist bekannt, Kollagen als Träger für Antibiotika,  
5 wie Gentamycin zu verwenden. Auch die erfindungsge-  
mäßen Wundauflagen können Wirkstoffe enthalten,  
beispielsweise Gentamycin, Tetracyclin oder  
andere Antibiotika oder Chemotherapeutika.

10 Herstellung von Kollagen:

Von allen Pigmentschichten und Muskelresten befreite  
frische Rindersehnen wurden homogenisiert und eine  
Menge, die 100 g Trockengewicht entspricht, in 3 l  
15 0,05 m Zitratpuffer (pH 3,7) 24 Stunden lang extra-  
hiert und anschließend gegen 1 % Essigsäure 12 Stun-  
den dialysiert. . .

Das in 3 l 1 % Essigsäure suspendierte Gewebe wird  
20 48 Stunden bei 10°C unter ständigem Rühren mit Pep-  
sin im Verhältnis Kollagen : Pepsin = 50 : 1 inku-  
biert.

Der Ansatz wird mit 1 % Essigsäure auf 5 l verdünnt  
25 und durch Zentrifugation von den ungelösten Sehnen-  
fragmenten befreit.

Die viskose Kollagenlösung wird gegen alkalisiertes  
Leitungswasser (pH 8,0) dialysiert und dann scharf  
30 zentrifugiert. Der Rückstand wird erneut in 5 l  
1 % Essigsäure gelöst und dialysiert. Dieser Vorgang  
wird wiederholt, bis der Faktor Stickstoff:4-Hydroxy-  
prolin < 3 ist. Nach dem letzten Dialysieren wird  
mit 0,05 % Essigsäure eine 1,5 %-ige Kollagenlösung  
35 hergestellt, die für die nachfolgenden Versuche ver-  
wendet wird.

Zur Herstellung einer Antifibrinolytika- und/oder Proteinaseinhibitor-haltigen Kollagenschwamms von  
10 x 10 x 0,5 cm werden 50 ml der Kollagenlösung mit  
0,2 g Tranexamsäure und/oder 40.000 KIE Aprotinin  
5 versetzt und gefriergetrocknet.

Zur Herstellung eines Kollagen-Gentamycin-Schwamms  
von 10 x 10 x 0,5 cm werden 50 ml der Kollagenlösung  
auf pH 1 bis 2 eingestellt, mit 100 mg Gentamycinsulfat  
10 versetzt und gefriergetrocknet.

Herstellung von Fibrinogenlösung:

Im Handel befindliches steriles Fibrinogen wird in  
15 steriler isotoner Na HCl gelöst, so daß eine Lösung von  
30 mg Fibrinogen/ml Lösung vorliegt, die für die  
nachfolgenden Versuche verwendet wird.

Um ein SH-Gruppen-modifiziertes Fibrinogen zu erhalten,  
20 arbeitet man wie folgt:

Fibrinogen wird in isotoner Kochsalzlösung bis zu einer  
Konzentration von 20 mg/ml gelöst. 10 ml dieser Fibri-  
nogenlösung werden mit 1 ml einer N-Acetylhomocystein-  
25 thiolaktonlösung (60 mg/ml Aqua dest) und 10 ml eines  
Carbonatpuffers (pH 10,6) versetzt und bei 0°C 35 Minuten  
inkubiert. Die Reaktion wird dann durch Zugabe von 40 ml  
eines Phosphatpuffers pH 7,0 i 0,4 gestoppt. Anschließend  
wird mit der Technik der Membranfiltration unter  
30 Verwendung eines Filters (Ausschlußgrenze Molekulargewicht  
5.000) die Lösung entsalzt und gleichzeitig eingeengt.

0090997

Herstellung von Wundauflagen, die Kollagen und  
Fibrinogen enthalten:

Es wird zunächst 100 ml einer 1 %-igen Kollagen-  
5 lösung in eine Metallform von 10 x 10 cm gege-  
ben, nach üblicher Technik gefriergetrocknet und  
der resultierende Schwamm dann sterilisiert. Unter  
aseptischen Bedingungen wird nun dieser sterilisierte  
Kollagenschwamm mit einer Fibrinogenlösung besprüht,  
10 wobei pro Quadratzentimeter Kollagenoberfläche  
5 mg Fibrinogen aufgetragen werden.  
Anschließend erfolgt eine erneute Gefrieretrocknung  
und Verpackung unter sterilen Kautelen.  
Die Kollagenschicht hat eine Dicke von 10 mm  
15 und die darauf befindliche Fibrinogenschicht eine  
Dicke von ca. 0,3 mm.

Resultate der in vitro und in vivo Versuche mit Kolla-  
gen-Fibrinogen sowie Gentamycin-Kollagen-Fibrinogen-  
20 Schwämmen.

In vitro:

Die so hergestellten Wundauflagen wurden mit einer  
25 Reißfestigkeitsmaschine getestet, bestehend aus einem  
Kraftaufnehmer, verbunden mit einem Schreiber. Die  
Eichung erfolgte im Bereich von 100 bis 1000 Pond. Die  
Kollagen-Fibrinogenschämme wurden mit der Kollagenseite  
auf eine Plastikscheibe ( $D=1$  cm) mittels eines tech-  
30 nischen Klebers geklebt. Die fibrinogenbeschichtete  
Seite wurde dann mit 0,1 ml Thrombinlösung (1000 NIH/ml)  
befeuert und nach 20 Minuten in der Testmaschine die  
Reißfestigkeit bestimmt. Es resultierten Werte von  
730 Pond/cm<sup>2</sup> (Mittelwert aus 7 Messungen).

In vivo:

In einer Studie an 400 Ratten wurden die (Gentamycin)  
Kollagen-Fibrinogen-Wundauflagen (als Fibrocoll be-  
5 zeichnet) zur Anastomosensicherung am Colon mit der  
herkömmlichen Gewebeklebung mit Plasmafraktionen (Fi-  
brinklebesystem = FK) untersucht.

a) Kontrollgruppe (Enterotomien mit 7 invertierenden  
10 Einzelknopfnähten nach Lembert.

b) zusätzliche Applikation von FK

c) FK mit Kollagenvlies (fibrinogen-, gentamycin-frei)  
15

d) Nahtsicherung mit Fibrocoll

e) Fibrocoll mit Gentamycin (1 mg/cm<sup>2</sup>)

20 In der Initialphase der Wundheilung zeigten die mit ver-  
schiedenen Klebesystemen behandelten Tiere bis zum  
3. postoperativen Tage im Nahtbereich eine deutlich

25

---

höhere Wundfestigkeit. Gegenüber der herkömmlichen Fibrinklebetechnik waren bei Verwendung von Fibrocoll Adhäsionen im Wundbereich vermindert. Durch die Applikation der Gentamycin-Kollagen-Fibrinogen Wundauflagen 5 wurde eine kontrollierte Freigabe des Antibiotikums beobachtet, die Serumkonzentrationen lagen weit unter der toxischen Grenze.

In einer weiteren Versuchsserie wurden Hemihepatektomien 10 in "finger fracture technique" bei 5 Schweinen durchgeführt und nach Ligatur der faßbaren Arterien und Venen die blutenden Parenchymdefekte mit Kollagen-Fibrinogen-Wundauflagen versorgt. Im folgenden postoperativem Verlauf wurden Nachblutungen nie beobachtet, die 15 Resorption der Materialien war nach 12 Wochen abgeschlossen.

Mit den (Gentamycin) Kollagen-Fibrinogen-Wundauflagen steht ein Material zur Verfügung das bei einfacher, rascher, sicherer Handhabung ausgezeichnet zur Blutstillung eingesetzt werden kann. Weiter wird eine Verbesserung der Wundheilung bei gleichzeitigem Antibiotikaschutz beobachtet.

Patentansprüche:

1. Trockene, vlies- oder schwammförmige, gewebeverklebbare, flächenförmige, kollagene Wundauflage aus Kollagen und Fibrinogen, dadurch gekennzeichnet, daß sie schichtweise durch Gefriertrocknung einer Kollagen/Fibrinogen-Kombination aufgebaut ist und eine 0,3 bis 2 cm dicke Kollagenschicht enthält, die wenigstens an einer Oberfläche eine 0,2 bis 2 mm dicke Fibrinogenschicht mit einer Fibrinogenmenge von 0,5 bis 10 mg/cm<sup>2</sup> aufweist und in dem Kollagen verankert ist.  
5
2. Wundauflage gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Fibrinogen SH-Gruppen enthält.  
10
3. Wundauflage gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Fibrinogen SH-Gruppen enthält, die entweder durch nachträgliche Sulfhydrierung in das Fibrinogenmolekül eingebracht oder durch Reduktion der Disulfidbrücken im Fibrinogenmolekül gebildet wurden.  
15
4. Wundauflage gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich einen Arzneimittelwirkstoff enthält.  
20
5. Wundauflage gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie in wenigstens einer der Schichten Antifibrinolytika und/oder polyvalente Proteinaseinhibitoren und/oder Thrombin enthält, wobei jedoch die Kombination Thrombin-Fibrinogen in einer Schicht ausgeschlossen ist.  
25

- 12 -

6. Wundauflage gemäß Anspruch 4, dadurch  
gekennzeichnet, daß der Arzneimittel-  
wirkstoff ein Antibiotikum ist.

5 7. Wundauflage gemäß Anspruch 6, dadurch  
gekennzeichnet, daß das Antibiotikum  
Gentamycin ist.

10 8. Wundauflage gemäß Anspruch 1, dadurch  
gekennzeichnet, daß das Kollagen  
einen Reinheitsgrad, ausgedrückt durch das Ge-  
wichtsverhältnis von Stickstoff zu 4-Hydroxyprolin  
von < 4, vorzugsweise < 3 hat.

15

20

25

30

35

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**